

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE**

*INDIRIZZO: SCIENZE IMMUNO-REUMATOLOGICHE*

**XXI Ciclo**

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

**TESI DI DOTTORATO**

**ANGIOEDEMA EREDITARIO:  
ASPETTI DIAGNOSTICI, CLINICI E TERAPEUTICI  
IN UNA POPOLAZIONE DI PAZIENTI  
DELLA REGIONE CAMPANIA**

**TUTOR**

**Chiar.mo  
Prof. Massimo Triggiani**

**CANDIDATA**

**Dott. Maria Bova**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<i>pag.</i> 2
<b>SCOPO DELLO STUDIO</b>	<i>pag.</i> 13
<b>MATERIALI E METODI</b>	<i>pag.</i> 14
- Reclutamento dei Pazienti presso il Centro di Allergologia e Immunologia Clinica	<i>pag.</i> 14
- Dosaggio Funzionale del C1 Inibitore	<i>pag.</i> 15
- Diagnosi di Angioedema Ereditario	<i>pag.</i> 15
- Follow up dei Pazienti	<i>pag.</i> 16
- Arruolamento dei Pazienti per la Sperimentazione Clinica sull'Efficacia del C1 Inibitore Ricombinante Umano	<i>pag.</i> 17
- Descrizione del Farmaco	<i>pag.</i> 17
- Protocollo dello Studio	<i>pag.</i> 18
<b>RISULTATI</b>	<i>pag.</i> 23
- Percorso Diagnostico dei Pazienti con Angioedema	<i>pag.</i> 23
- Caratteristiche Cliniche dei Pazienti con Angioedema Ereditario	<i>pag.</i> 25
- Pazienti Trattati con C1 Inibitore Ricombinante Umano	<i>pag.</i> 29
<b>DISCUSSIONE</b>	<i>pag.</i> 34
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<i>pag.</i> 37

## INTRODUZIONE

L'Angioedema Ereditario (AE) è una patologia rara che si manifesta con ricorrenti episodi di edema facciale, laringeo, genitale o periferico e con episodi di dolore addominale acuto, secondario ad edema intra-addominale (1). Tale condizione deriva da un difetto genetico che viene trasmesso come carattere autosomico dominante e può essere causato da diverse mutazioni a carico del gene dell'inibitore della C1 esterasi (C1 Inh) (2), localizzato sul cromosoma 11 (3). L'inefficienza del C1 Inh determina un'attivazione incontrollata del sistema del complemento. C1 Inh, membro della famiglia degli inibitori delle proteasi seriniche (SERPIN), è il principale inibitore di numerose proteasi del complemento (C1r, C1s, MASP1 e 2) e proteasi del sistema di contatto (callicreina, fattore della coagulazione XIIa); questa proteina inibisce, inoltre, la proteasi fibrinolitica plasmina e il fattore proteasico della coagulazione XIa (4). Durante gli attacchi di angioedema ereditario, queste cascate proteolitiche vengono attivate e generano diverse sostanze vasoattive. Numerosi studi hanno dimostrato che la bradichinina è il principale mediatore dell'aumento della permeabilità vascolare durante gli attacchi di angioedema ereditario (5). La bradichinina è un nanopeptide generato dall'attivazione del sistema di contatto; essa, legandosi al suo recettore B2 presente sulle cellule endoteliali, è capace di incrementare notevolmente la permeabilità vascolare (6).

Sono state descritte diverse mutazioni del gene che portano al deficit di C1 Inh e circa il 25% di esse insorgono *de novo*. Nessuna mutazione associata alla patologia risulta particolarmente ricorrente; al contrario, le mutazioni sono così numerose da poter praticamente affermare che ogni nucleo familiare presenta la sua propria mutazione (7). Finora sono state descritte più di 150 mutazioni (8) che possono essere divise in due gruppi: a) mutazioni puntiformi, che costituiscono l'85% dei casi e comportano la sostituzione, la delezione o l'inserzione di un singolo nucleotide; b) grosse mutazioni che interessano parti estese del gene e rappresentano il restante 15%. Al di là dell'importanza genetica della malattia, l'identificazione delle mutazioni del gene di C1 Inh riveste un particolare interesse in quanto questa proteina fa parte della famiglia delle serpine. Le serpine possiedono un particolare meccanismo di azione per il quale vengono ad assumere conformazioni diverse a seconda dello stato in cui si trovano. Mutazioni in queste proteine comportano un'alterata capacità di modellarsi e possono dare luogo a patologie che vengono quindi dette "conformazionali". Nel caso dell'AE le mutazioni possono alterare la normale sintesi proteica a tutti i livelli, da un blocco della trascrizione con impossibilità di formazione dello specifico messaggero ad alterazioni che determinano la sintesi e la secrezione di un prodotto proteico che risulta, però, funzionalmente alterato. Responsabili della sintesi di proteine disfunzionali sono quelle mutazioni puntiformi che causano sostituzione di un singolo aminoacido nella regione che codifica per il sito reattivo della proteina. Sono note numerose di queste mutazioni, alcune delle quali studiate in dettaglio nei loro aspetti

funzionali. Ai fini della malattia è importante notare che benché il deficit di C1 Inh sia costante e invariato per tutta la vita, i sintomi sono episodici: si va da soggetti con gravi sintomi che si presentano con frequenza pressoché quotidiana ad altri individui praticamente asintomatici per tutta la vita. E' chiaro quindi che il deficit di C1 Inh è necessario ma non sufficiente alla formazione di angioedema (9). La variabile che episodicamente interviene a scatenare i sintomi è oggi identificata nel sistema di contatto, i cui componenti, in gran parte, coincidono con quella che veniva prima indicata come via intrinseca della coagulazione. C1 Inh ha molteplici siti di intervento sul sistema di contatto (5). Le ridotte quantità di C1 Inh rilevabili nei soggetti con AE consentirebbero il controllo di questo sistema in condizioni normali, ma non in condizioni di richiesta aumentata. Il più chiaro esempio di aumentata richiesta è quella che si genera con un microtrauma: noto evento attivatore del sistema di contatto e noto fattore scatenante degli episodi di angioedema (10). Una delle mutazioni che portano a deficit funzionale di C1 Inh determina selettivamente la perdita della capacità di inibire l'attivazione del complemento, ma non di inibire i fattori del sistema di contatto (11). I soggetti con questa mutazione hanno una marcata attivazione della via classica complementare, con consumo di C4, ma non sviluppano mai angioedema, verosimilmente perchè il loro sistema di contatto è efficacemente controllato. Allo stato attuale delle conoscenze si può quindi ritenere che soggetti carenti di C1 Inh presentano una cronica e marcata attivazione della via classica complementare cui consegue consumo di C4 che, infatti, risulta costantemente

ridotto (12). Eventi come il microtrauma, ma probabilmente diversi altri ancora non identificati, determinano attivazione locale del sistema di contatto. Come dimostrato da studi in vivo e in vitro, in presenza di un difetto dei meccanismi di controllo, l'attivazione del sistema di contatto si sviluppa in maniera eccessiva, inducendo la formazione di abnormi quantità di bradichinina, potente peptide vasoattivo, generato dalla scissione del chininogeno ad alto peso molecolare da parte della callicreina (13-15). La **Figura 1** riporta in maniera schematica i meccanismi patogenetici dell'angioedema da carenza di C1 Inh (16).

Nel nostro Paese non sono ancora disponibili dati precisi sulla reale prevalenza della malattia, ma si stima che essa sia di circa 1/50.000 (17). Sono note due varianti fenotipiche della malattia: tipo 1 e tipo 2. Il tipo 1 è determinato dalla mancata formazione della proteina (*mutazione di stop*). Questo fenotipo è caratterizzato da bassi od indosabili livelli plasmatici di C1 Inh, sia antigenici che funzionali (18-20). Nel tipo 2 invece viene sintetizzata una proteina non funzionante (*mutazione nonsense*). In questo caso, l'attività funzionale del C1 Inh è decisamente ridotta, mentre i suoi livelli antigenici possono essere normali o aumentati (20-23). Recentemente è stata descritta una terza variante, angioedema ereditario di tipo 3 (18, 24, 25), una condizione non legata a carenza di C1 Inh. L'eziologia di questa forma rimane non definita. In alcuni casi sono state identificate mutazioni nel Fattore XII della coagulazione (fattore di Hageman) (26).

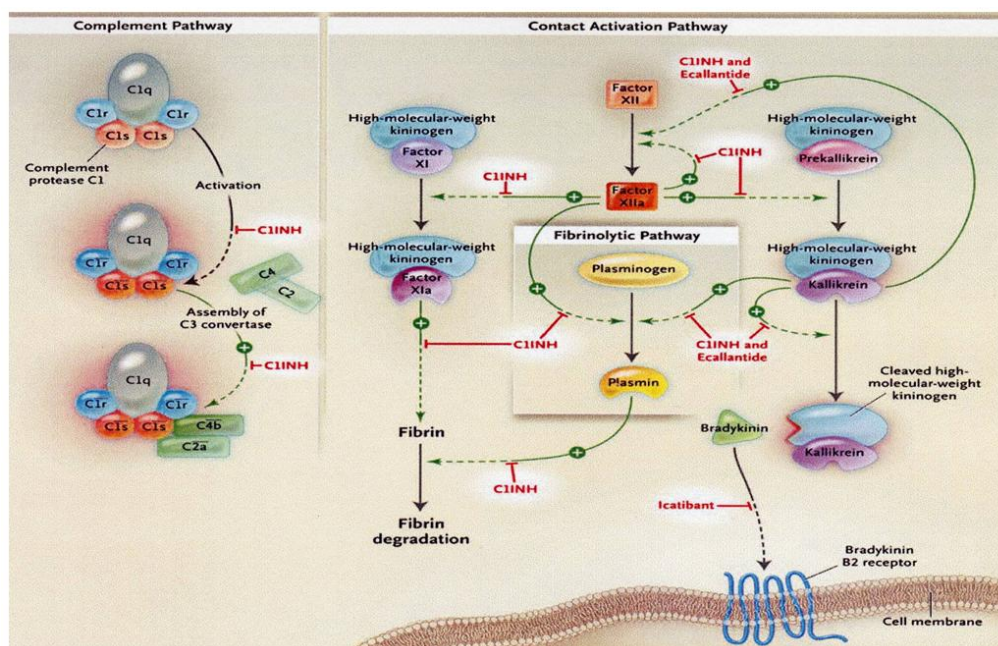


Figura 1. Schema del meccanismo fisiopatologico dell'AE ( da Zuraw, B. L. *N Engl J Med* 2008, 359:1027-1036).

Le manifestazioni cliniche, che insorgono solitamente entro la seconda decade di vita, consistono in angioedemi ricorrenti che possono interessare il sottocute e/o le mucose dell'apparato gastroenterico o delle alte vie respiratorie. L'orticaria non fa parte del quadro clinico dell'angioedema ereditario. Fugaci rush eritematosi, di solito con aspetto a carta geografica (eritema marginato), possono precedere la comparsa del tipico angioedema (27). L'angioedema cutaneo ha tipicamente un andamento lento: esso provoca una deformazione del distretto colpito che aumenta progressivamente fino a raggiungere l'estensione massima in 12-36 ore e poi regredisce completamente in un tempo che varia tra 2 e 4 giorni. Più spesso viene interessato un singolo distretto, ma non è infrequente una localizzazione multipla o un andamento migrante. Se l'angioedema interessa le mucose gastrointestinali si estrinseca in

una grave sintomatologia dolorosa, spesso con vomito e (meno frequentemente) diarrea. Talvolta, nel corso degli episodi addominali, che durano nella fase acuta da 12 a 48 ore, non ci sono elementi che consentano una differenziazione certa da un'emergenza chirurgica. L'ecografia di solito mostra un piccolo versamento peritoneale mentre all'emocromo può essere presente una modesta leucocitosi (28). L'evenienza clinica più grave dell'AE rimane, comunque, l'edema laringeo. Questa localizzazione, presente in più della metà dei pazienti, è causa di morte nel 25-30% dei casi in cui costituisce il sintomo d'esordio della malattia (29, 30). Alcuni pazienti, dopo drammatiche esperienze, arrivano a richiedere la creazione di uno stoma con cannula endotracheale permanente che garantisce comunque la sopravvivenza in caso di edema laringeo. Nella maggior parte dei pazienti è presente una storia familiare di angioedema. Bisogna però ricordare che circa il 25% dei pazienti sono portatori di una mutazione *de novo* e, quindi, hanno genitori sani.

L'angioedema acquisito è una condizione ancora più rara dell'angioedema ereditario ed è caratterizzata dal consumo del C1 Inh e dall'iperattivazione della via classica del complemento (31). Responsabili del consumo di C1 Inh possono essere patologie associate (soprattutto linfoproliferative) e/o autoanticorpi diretti contro questa proteina (32, 33). La presentazione clinica è simile a quella dell'angioedema ereditario ma elementi caratteristici sono l'assenza di storia familiare, la tardiva comparsa di sintomi (generalmente dopo la quarta decade di vita) e la diversa risposta ai trattamenti (34).



L'angioedema da carenza di C1 Inh, sia esso ereditario che acquisito, si presenta tipicamente senza orticaria e va pertanto distinto da altre forme di angioedema senza orticaria (35). La **Tabella 1** riporta l'attuale classificazione generale degli angioedemi ricorrenti.

Le principali forme di angioedema non legato a carenza di C1 Inh sono:

- angioedema legato all'assunzione di farmaci, in particolare ACE inibitori (lo 0.2% dei pazienti che assume ACEI sviluppa angioedema), estrogeni e FANS (36);
- angioedema legato ad alimenti o punture d'insetto;
- angioedema idiopatico, istaminergico o non istaminergico;
- angioedema associato ad altra malattia (generalmente infettiva o autoimmune) (37).

- **Idiopatico con o senza orticaria (più frequente)**
- **Allergico**
  - ☐ *farmaci*
  - ☐ *alimenti*
  - ☐ *altri allergeni*
- **Da cause fisiche (vibrazione)**
- **Associato a malattie autoimmuni (tiroidite, LES, etc.)**
- **Complemento-mediato**
  - ☐ *da deficit di C1 INH*
    - 1) ereditario
      - *tipo 1 deficit antigenico: 80-85 % dei casi*
      - *tipo 2 deficit funzionale: 10-15 % dei casi*
    - 2) acquisito
      - *tipo 1 : associato a tumori, nella maggior parte dei casi linfoproliferativi*
      - *tipo 2 : causato da autoanticorpi anti-C1 INH*
  - ☐ *da farmaci (ACE-inibitori)*

**Tabella 1. Classificazione degli angioedemi ricorrenti**

I criteri per porre diagnosi di AE comprendono valutazioni cliniche e di laboratorio. La diagnosi può essere stabilita in presenza di almeno uno dei seguenti criteri clinici e di almeno un criterio di laboratorio (in presenza del solo criterio clinico 4 e di 1 criterio di laboratorio, il paziente viene definito “portatore asintomatico”) (38).

#### **Criteri Clinici:**

1. Angioedema sottocutaneo, non pruriginoso, non eritematoso, autolimitantesi, solitamente ricorrente e di lunga durata (più di 12 ore), con nessuna o scarsa orticaria, talvolta preceduto da eruzione cutanea a tipo eritema marginato.
2. Dolori addominali ricorrenti (spesso con vomito e/o diarrea) senza altra causa, a risoluzione spontanea in 12-72 ore.
3. Edemi ricorrenti laringei.
4. Storia familiare conclamata di angioedema da carenza di C1 Inh.

#### **Criteri di Laboratorio:**

1. Livelli antigenici di C1 Inh <50% del normale in 2 determinazioni separate e dopo il primo anno di vita.
2. Livelli di attività funzionale di C1 Inh <50% del normale in 2 determinazioni separate e dopo il primo anno di vita.

3. Mutazione del gene di C1 Inh che altera la sintesi e/o la funzionalità della proteina.

La malattia, quando correttamente diagnosticata, può essere trattata adeguatamente. Le finalità del trattamento dell'AE sono rivolte a:

1. evitare comportamenti/terapie che favoriscono l'insorgenza degli attacchi (39-41);
2. eliminare la mortalità e ridurre le conseguenze degli eventi acuti (terapia dell'attacco acuto);
3. ridurre gli effetti invalidanti della malattia che derivano dalla frequente ricorrenza di eventi acuti (profilassi a lungo termine);
4. prevenire lo scatenamento di attacchi in condizioni particolari (profilassi a breve termine).

Esiste la possibilità di una terapia continuativa per la prevenzione degli attacchi acuti di angioedema. Tale terapia non è scevra da effetti collaterali. Pertanto si rende necessario un attento bilancio rischio/beneficio prima di iniziarla (1). E' da considerare la profilassi a lungo termine nei soggetti che presentano attacchi moderati/severi o severi con frequenza superiore ad 1 al mese, o in quei soggetti nei quali, comunque, l'inabilità per angioedema supera i 5 giorni al mese. La profilassi a breve termine è invece raccomandata in condizioni che possono determinare lo scatenamento di un edema laringeo quali traumatismi sul cavo oro-faringeo (interventi odontoiatrici, endoscopie, interventi chirurgici in anestesia con o senza intubazione).

Per la terapia profilattica a breve e a lungo termine si possono utilizzare i seguenti farmaci: androgeno-derivati (42-46); antifibrinolitici (47, 48); C1 Inh umano (19, 49) (**Tabella 2**).

La terapia degli edemi laringei e degli attacchi addominali gravi consiste nella somministrazione del concentrato plasmatico di C1 Inh (50, 51). Il concentrato plasmatico della proteina carente, infuso in dose di 1.000-2.000 unità, risulta infatti prontamente efficace nel bloccare gli episodi di angioedema (52, 53). A 30-60 minuti dalla somministrazione il paziente avverte un marcato miglioramento che rappresenta l'inizio della regressione dell'edema, che poi risolve completamente in alcune ore (54, 55). Il farmaco risulta ben tollerato, anche se, come altri emoderivati, può causare reazioni di tipo allergico. Il problema maggiore del C1 Inh plasmatico è soprattutto quello della possibile trasmissione di agenti infettivi; attualmente, dopo l'introduzione delle metodiche di inattivazione virale, i rischi infettivi sono diventati praticamente nulli. Nonostante ciò, essendo questo farmaco un emoderivato, esiste un possibile rischio di trasmissione di virus umani patogeni. A questo problema si accompagnano gli alti costi di produzione e la dipendenza della produzione del farmaco dalla disponibilità di sangue umano. E' stato quindi prodotto un C1 Inh umano ricombinante (rhC1 Inh), sintetizzato in animali transgenici (56-58), attualmente in sperimentazione clinica di fase 3. Sono stati invece conclusi gli studi di fase 3 per altri due farmaci con l'indicazione al trattamento degli attacchi acuti nei soggetti con angioedema da carenza di C1 Inh, ossia l'inibitore ricombinante della callicreina plasmatica (59, 60) e l'antagonista dei

recettori B2 della bradichinina (36, 61). Questi farmaci sono in attesa di autorizzazione all'immissione in commercio. I risultati degli studi clinici sull'efficacia e tollerabilità di questi farmaci sono stati comunicati a congressi internazionali, ma non sono ancora disponibili su pubblicazioni scientifiche in estenso.

<b>Terapia Profilattica</b>		
	<b>A lungo termine</b>	<b>A breve termine</b>
<b>C1 Inibitore umano</b>		<b>1.000-2.000 U e.v.</b>
<b>Acido Tranexamico</b>	<b>0,5-1 g x 3/die</b>	
<b>Danazolo</b>	<b>400-600mg/die per un mese, riducendo poi fino alla dose minima efficace (50-200 mg/die)</b>	<b>600 mg/die da 5 giorni prima della manipolazione del cavo orale e fino a 3 giorni dopo</b>

**Tabella 2. Terapia profilattica dell'AE**

## **SCOPO DELLO STUDIO**

Lo scopo delle ricerche effettuate nel corso dei tre anni del Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia Clinica e Sperimentale è stato duplice:

- 1) caratterizzare dal punto di vista clinico, diagnostico e terapeutico un gruppo di pazienti afferenti al Centro per l'Angioedema Ereditario dell'Università degli Studi di Napoli Federico II;
- 2) avviare una sperimentazione clinica per la valutazione dell'efficacia e tollerabilità del C1 Inh ricombinante umano nel trattamento degli attacchi acuti di Angioedema Ereditario.

## **MATERIALI E METODI**

### **Reclutamento dei Pazienti presso il Centro di Allergologia e Immunologia Clinica**

Il Centro per l'AE afferente alla Cattedra di Allergologia e Immunologia Clinica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II è stato attivato nel Gennaio 2004. Un primo gruppo di pazienti residenti in Campania è giunto alla nostra osservazione alla fine del percorso diagnostico. In questi pazienti la diagnosi era cioè stata effettuata presso altri Centri che li hanno poi inviati alla nostra osservazione in seguito all'apertura del nostro Centro.

Un secondo gruppo di pazienti è giunto invece alla diagnosi di AE al termine di un percorso diagnostico svolto presso il nostro Centro. In quest'ultimo caso, sono stati valutati 84 pazienti afferenti ai nostri ambulatori per angioedema (senza orticaria), sintomi gastrointestinali e/o episodi di edema delle alte vie respiratorie. Per ciascun paziente sono stati effettuati un rigoroso esame clinico ed una attenta anamnesi con particolare attenzione ad eventuali allergie o potenziali cause di angioedema. Ai pazienti con storia clinica suggestiva per angioedema da carenza di C1 Inh sono stati praticati prelievi ematici al fine di effettuare:

- dosaggio C1 Inh antigenico;
- dosaggio C4;
- dosaggio C1 Inh funzionale.

I livelli ematici di C1 Inh e C4 sono stati determinati nei laboratori centralizzati dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Federico II, mentre il dosaggio del C1 Inh funzionale è stato effettuato presso i nostri laboratori.

### **Dosaggio Funzionale del C1 Inibitore**

I campioni ematici in NaCitrato sono stati centrifugati (30 min, 2.000 rpm, 22°C) ed il plasma raccolto è stato conservato a -20°C per un tempo massimo di 30 giorni. L'attività di C1 Inh nei campioni è stata misurata mediante test colorimetrico disponibile in commercio (Technochrome C1-INH, Technoclone GmbH, Vienna, Austria). Il range di linearità di questo dosaggio era: 0,70-1,30 Unità C1 INH/ml (1 unità di C1 Inh corrisponde all'attività media del C1-esterasi-inibitore presente in 1 ml di plasma normale citratato). La funzionalità del C1 Inh è stata anche espressa come percentuale dell'attività del C1 Inh presente nei campioni. Abbiamo considerato nella norma i valori superiori a 0,7 Unità C1 Inh/ml (>70%).

### **Diagnosi di Angioedema Ereditario**

La diagnosi di AE è stata effettuata secondo i criteri riportati in letteratura (38). Nella maggior parte dei pazienti la diagnosi è stata posta sulla base della storia clinica di angioedema sottocutaneo autolimitantesi non accompagnato da orticaria, ricorrente e con durata superiore alle 12 ore in presenza di livelli antigenici e/o funzionali di C1 Inh nel plasma inferiori al 50% dei valori normali. E' stata effettuata diagnosi di AE di tipo I in presenza



di bassi livelli plasmatici di C1 Inh sia antigenico che funzionale; la diagnosi di AE di tipo II è stata posta quando il livello funzionale di C1 Inh risultava al di sotto dei limiti della norma, mentre il livello di C1 Inh antigenico era normale.

### **Follow up dei Pazienti**

I pazienti affetti da AE sono stati seguiti quindi presso il nostro Centro in regime di DH o ambulatoriale. Tutti i pazienti sono stati sottoposti al momento della diagnosi alla radiografia del torace, ad ecografia addome ed ad indagini ematochimiche di routine con particolare attenzione alla valutazione della crasi ematica. I soggetti sottoposti a trattamento con C1 Inh e/o plasma sono stati monitorati per il rischio di infezioni in accordo a quanto previsto per gli utilizzatori di emoderivati. Ai soggetti che presentavano attacchi moderati/severi o severi con frequenza superiore ad 1 al mese, o in quei soggetti nei quali, comunque, l'inabilità per angioedema superava i 5 giorni al mese è stato consigliato di effettuare terapia profilattica a lungo termine. I pazienti in terapia con androgeno-derivati sono stati monitorati mediante valutazione clinica all'inizio della profilassi, a tre mesi, a sei mesi e quindi ogni anno. Particolare attenzione è stata posta in questi pazienti alla valutazione degli effetti ormonali degli androgeno-derivati attraverso l'esecuzione di esami ematochimici ed eco addome superiore con frequenza annuale ed indicazione specifica alla visualizzazione di lesioni epatiche. Ai pazienti di sesso maschile è stata consigliata una valutazione urologica ogni due anni.

In condizioni che potevano determinare lo scatenamento di un edema laringeo quali traumatismi sul cavo oro-faringeo (interventi odontoiatrici, endoscopie, interventi chirurgici in anestesia con o senza intubazione) è stato raccomandato ai pazienti di attuare la profilassi a breve termine.

### **Arruolamento dei Pazienti per la Sperimentazione Clinica sull'Efficacia del C1 Inibitore Ricombinante Umano**

Tra tutti i pazienti con diagnosi di AE di tipo 1 o di tipo 2 afferenti al nostro Centro ne sono stati selezionati alcuni eleggibili per uno studio multicentrico, randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco di fase III per valutare l'efficacia e la sicurezza dell'inibitore ricombinante del fattore C1 umano (Codice EUDRACT:C1 1304-01). Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli Federico II in data 13 Giugno 2005.

### **Descrizione del Farmaco**

Il farmaco utilizzato in questo studio (rhC1 Inh) è un analogo ricombinante umano del C1 Inh purificato da latte di conigli transgenici per il gene umano del C1 Inh (gene umano linked al promotore della  $\alpha$ S1-caseina bovina). La proteina ricombinante viene secreta nel latte dei conigli e viene purificata per oltre il 99,9%. Le caratteristiche farmacologiche del prodotto ricombinante sono comparabili a quelle del C1 Inh umano plasma-derivato. Gli studi sugli animali e quelli di fase I effettuati su pazienti asintomatici affetti da

AE hanno dimostrato che il rhC1 Inh è un farmaco sicuro e ben tollerato. In nessuno dei pazienti è stata rilevata presenza di anticorpi neutralizzanti la funzione del C1 Inh. L'emivita del rhC1 Inh è lievemente più breve di quella del C1 Inh umano plasma-derivato, probabilmente a causa del minore grado di glicosilazione.

### **Protocollo dello Studio**

Lo studio prevede innanzitutto una visita di screening in cui sono stati selezionati pazienti di età compresa tra i 16 e i 70 anni, con una diagnosi clinica di AE e con concentrazioni plasmatiche basali di C1 Inh inferiori al 50 % dei valori normali (la partecipazione allo studio avviene previa compilazione e firma del consenso informato da parte dei pazienti). Durante questa fase iniziale viene raccolta l'anamnesi, registrato l'elettrocardiogramma ed effettuati esame obiettivo e prelievo di sangue e urine per esami di routine. Al termine di tali indagini il paziente viene considerato eleggibile per la partecipazione allo studio rispettando i seguenti criteri di esclusione:

- storia di terapia farmacologica a base di prodotti derivati dal coniglio (per es. antisieri, rhC1 Inh) unitamente a eventuali evidenze di reazioni allergiche associate;
- storia di anafilassi o gravi allergie (cioè richiedenti una terapia farmacologica) ad alimenti, proteine e/o farmaci;
- storia di reazioni allergiche ai concentrati di C1 Inh o alle proteine di coniglio;

- diagnosi di carenza acquisita di C1 Inh;
- gravidanza, allattamento o intenzione di avere un figlio a breve;
- tossicodipendenza nota o sospetta;
- donazione di sangue negli ultimi tre mesi;
- partecipazione ad un altro studio clinico nei tre mesi precedenti all'avvio di questo, oppure a due o più studi nei dodici mesi precedenti;
- qualsiasi valore anormale significativo emerso dalle analisi del sangue e delle urine e dai test biochimici.

Alla fase di arruolamento fa seguito la fase di randomizzazione, in cui i pazienti che sono risultati eleggibili durante la fase di screening sono invitati a rivolgersi al nostro centro entro 5 ore dall'esordio dell'attacco acuto della patologia o sviluppo di un grave attacco addominale e/o grave angioedema del distretto facciale-orofaringeo e/o angioedema della laringe e/o grave angioedema della regione genito-urinaria e/o angioedema periferico. I pazienti devono notificare e illustrare i sintomi allo sperimentatore prima di recarsi presso il Centro. Arrivati al Centro i pazienti valutano la severità dell'attacco mediante una Scala Analogico-Visiva (VAS) in cui 0 mm indica "nessun sintomo" e 100 mm significa "estremamente disabilitante". Per essere incluso nello studio il paziente deve riconoscere una severità di almeno 50 mm in almeno un distretto alla baseline, ossia nel momento iniziale. Tale criterio di inclusione è stabilito per consentire un sufficiente margine di miglioramento come risposta al

farmaco in studio. Inoltre non ci deve essere alcuna regressione dei sintomi di angioedema appena prima della somministrazione del farmaco in studio. Viene considerato miglioramento della sintomatologia una riduzione di 20 mm o più della scala analogico-visiva alla baseline rispetto al grado ottenuto nel momento di determinazione dell'eleggibilità. Durante la fase di randomizzazione i criteri di esclusione sono i seguenti:

- nessuna anormalità clinicamente significativa nelle analisi di routine di laboratorio;
- qualunque condizione o trattamento che nell'opinione dello sperimentatore, possa interferire con la valutazione degli obiettivi dello studio;
- pazienti che presentano un attacco che mette in pericolo la vita (un attacco che richiede procedure di emergenza immediate al fine di prevenire il decesso, danni relativi ad anossia o altri decorsi sfavorevoli);
- qualsiasi condizione o trattamento che possa interferire con la valutazione degli obiettivi dello studio;
- terapia a base di rhC1 Inh nelle tre settimane precedenti l'attacco.

La gravità dei segni di angioedema (nel complesso, nelle sedi elettive, in altre e/o nuove sedi) prima e dopo la somministrazione del rhC1 Inh viene valutata dal paziente mediante la VAS. Contemporaneamente l'evoluzione della gravità dell'angioedema viene valutata dal ricercatore mediante il

Physician's Score (PS), una scala di punteggi in cui lo 0 corrisponde a nessun sintomo, mentre 5 corrisponde alla massima gravità dei sintomi.

L'endpoint primario per la valutazione di efficacia del rhC1 Inh è il tempo in cui comincia il sollievo dai sintomi (basato sulle valutazioni del VAS da parte dei pazienti). L'endpoint secondario è la completa risoluzione basata sulla valutazione dei pazienti della VAS. In seguito alla somministrazione del farmaco è prevista una permanenza presso il centro di studio che può variare dalle 4 alle 24 ore, in base alle condizioni cliniche del paziente, e un controllo a 48 ore, oltre a due visite di follow-up rispettivamente a 22 e 90 giorni dalla somministrazione.

I parametri per la valutazione del profilo di sicurezza e della tollerabilità dell'rhC1 Inh sono ECG, segni vitali, eventi avversi, immunogenicità ed analisi di laboratorio di routine.

Da luglio 2006 è stato quindi condotto presso il nostro Centro e in numerosi Centri in Italia e all'estero la prima fase di questo studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, in cui i pazienti eleggibili sono stati randomizzati (1:1) per ricevere una infusione endovenosa di rhC1 Inh o placebo. Durante il corso di questo studio randomizzato controllato con placebo sono stati valutati dati provenienti da altri studi condotti in aperto con il rhC1 Inh. Tutti i soggetti trattati (14 pazienti per un totale di 21 attacchi) hanno risposto positivamente al rhC1 Inh, mostrando generalmente un tempo medio di remissione dai sintomi quantificabile in circa due ore, di gran lunga inferiore al tempo di

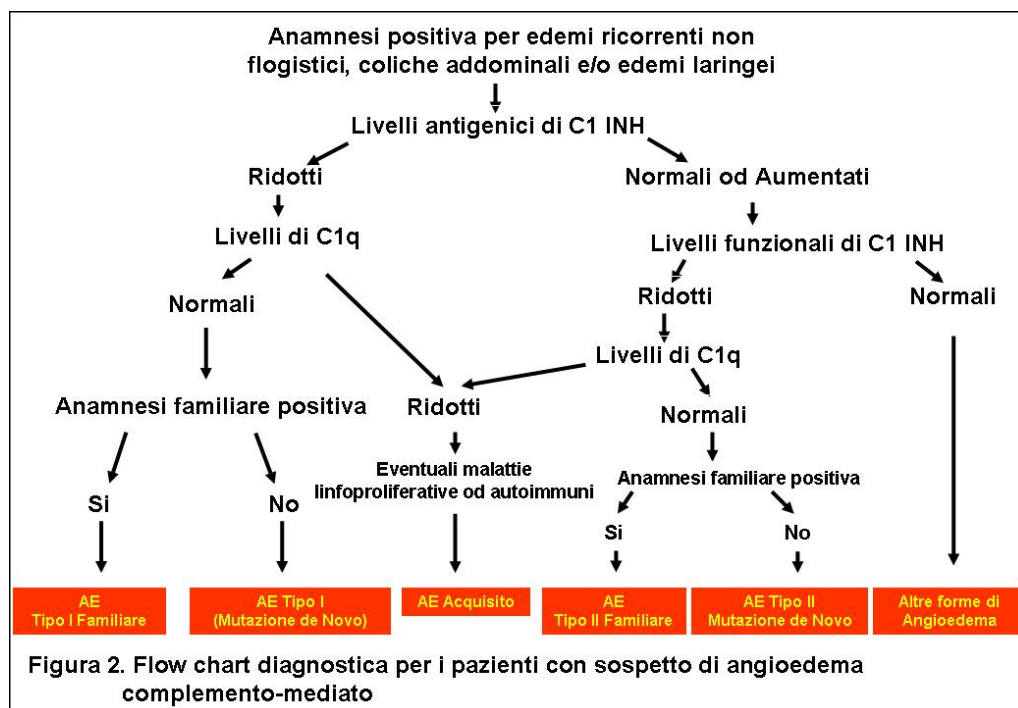
remissione previsto in pazienti con attacchi di angioedema ereditario non trattati o trattati con placebo. Per questo motivo a maggio 2007 lo Sponsor ha deciso di effettuare un'analisi ad interim sui pazienti trattati fino a quel momento. Tale analisi è stata effettuata su 28 pazienti ed ha dimostrato una significativa superiorità del rhC1 Inh sul placebo sia per quanto riguarda il primo (tempo in cui comincia la remissione dei sintomi,  $p=0.0009$ ) che il secondo endpoint (tempo per la completa risoluzione dei sintomi,  $p=0.0038$ ). Il tempo medio per l'inizio del sollievo e per la completa risoluzione dai sintomi con il rhC1 Inh è stato di 60 e 368 minuti rispettivamente, mentre con il placebo è stato di 508 e 1209 minuti rispettivamente. Inoltre i dati raccolti hanno confermato l'estrema tollerabilità del rhC1 Inh. Lo studio in doppio cieco è stato quindi interrotto in data 8 Agosto 2007 per motivi etici. Dalla suddetta data lo studio sta proseguendo in aperto per tutti i pazienti eleggibili al fine di raccogliere maggiori informazioni per quanto concerne la sicurezza del prodotto.

## RISULTATI

### Percorso Diagnostico dei Pazienti con Angioedema

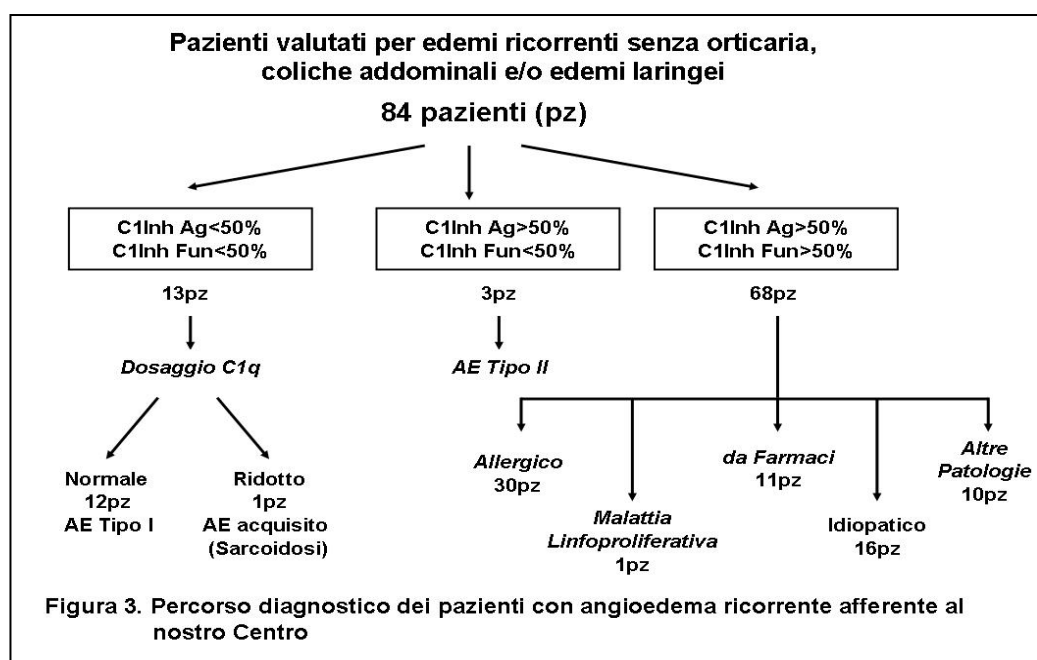
Attualmente presso il nostro Centro per la Cura e la Diagnosi dell'AE seguiamo 44 pazienti affetti da AE, appartenenti a 19 differenti famiglie. In 28 di questi pazienti la diagnosi è stata effettuata presso altri centri specializzati che ce li hanno poi inviati per competenza territoriale. Gli altri sono invece giunti alla nostra attenzione per la loro sintomatologia suggestiva per AE e sono stati quindi studiati presso il nostro Centro.

Dal 2004 al 2007, 84 pazienti sono afferiti al nostro Centro per sospetto di angioedema da carenza di C1 Inh. Questi pazienti sono stati sottoposti a dosaggio di C1 Inh antigenico e funzionale ed a valutazione dei livelli sierici di C4 e C1q, secondo la flow chart riportata in **Figura 2**.





In 68 casi entrambi i dosaggi sono risultati nei limiti della norma, per cui abbiamo indirizzato in altre direzioni le nostre indagini diagnostiche. Nei restanti 16 pazienti il dosaggio di C1 Inh antigenico e/o funzionale era al di sotto dei valori normali, per cui è stata posta diagnosi di AE. La **Figura 3** mostra il percorso diagnostico e le diagnosi definitive negli 84 pazienti. La diagnosi definitiva di angioedema da carenza di C1 inibitore veniva posta nel 19% dei pazienti (16/84). Di questi, il 75% (12/16) era affetto da AE di tipo 1, il 19% (3/16) da AE di tipo 2. Un solo paziente risultava affetto da AE acquisito. In questo caso si trattava di una forma secondaria a sarcoidosi. Il rimanente 77% (68/84) dei pazienti valutati, al termine del percorso diagnostico, risultava affetto da angioedema allergico (45%), da angioedema idiopatico (23%), da angioedema da farmaci (16%) o da angioedema associato ad altre patologie (15%). In un paziente veniva posta diagnosi di malattia linfoproliferativa.

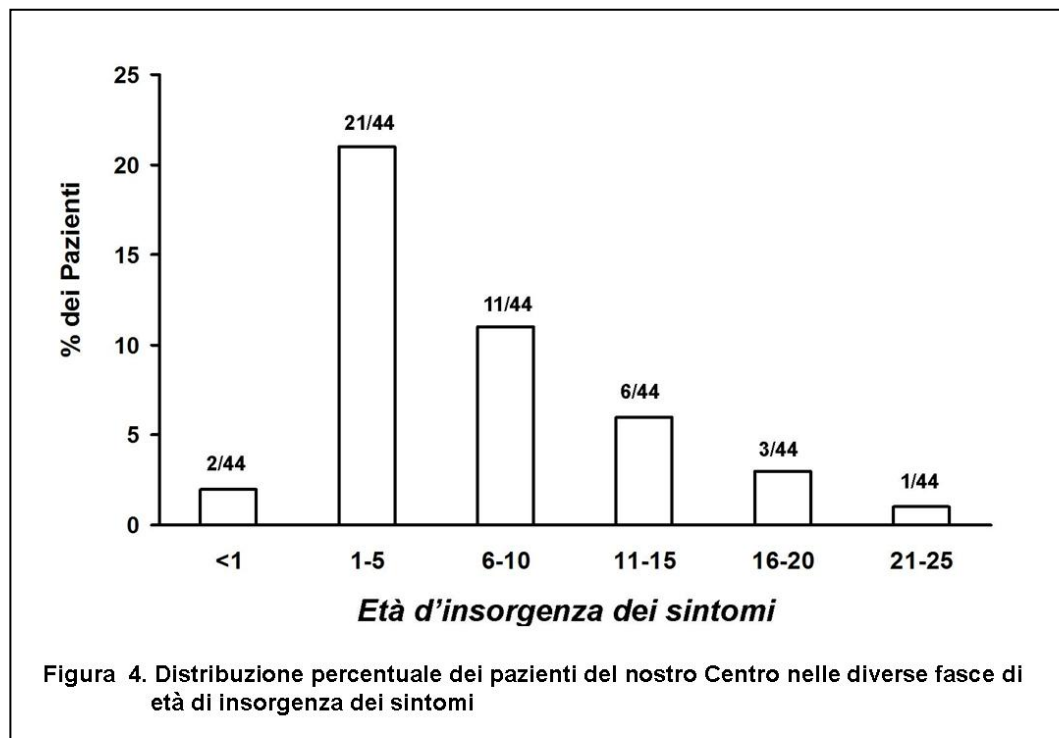


### **Caratteristiche Cliniche dei Pazienti con Angioedema Ereditario**

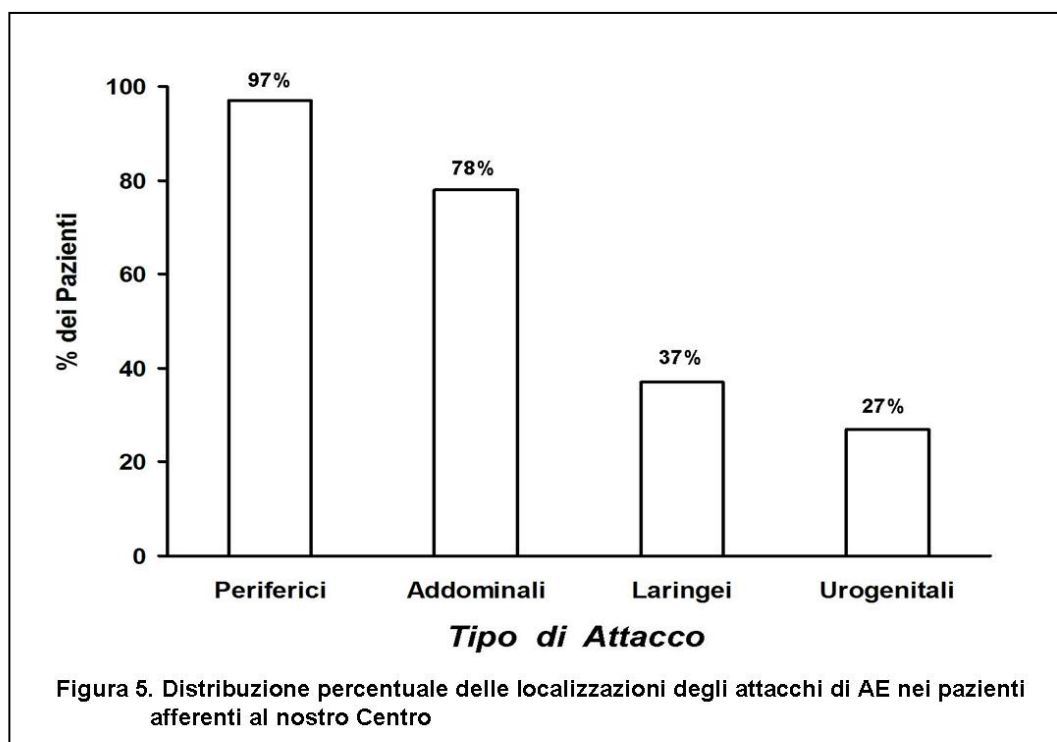
Durante i tre anni di follow up dei pazienti afferenti al nostro Centro abbiamo raccolto dati epidemiologici, clinici e terapeutici su un totale di 44 pazienti. Oltre ai 16 pazienti descritti nel paragrafo precedente (nuove diagnosi) sono, infatti, afferiti al Centro altri 28 pazienti la cui diagnosi era già stata posta in precedenza in altre Strutture.

La proporzione dei pazienti con AE di tipo 1 e di tipo 2 così come il range di età e la distribuzione maschi/femmine di questa popolazione è simile a quella riportata nella maggior parte delle casistiche (38). I nostri dati confermano che la maggior parte dei casi di AE esordisce entro i 20 anni di età. Questa è una caratteristica clinica importante nella diagnosi differenziale con l'angioedema acquisito che, in genere, esordisce in età più avanzata. Un dato particolarmente rilevante è costituito dal tempo medio che intercorre tra la comparsa dei sintomi e la diagnosi definitiva (15 anni).

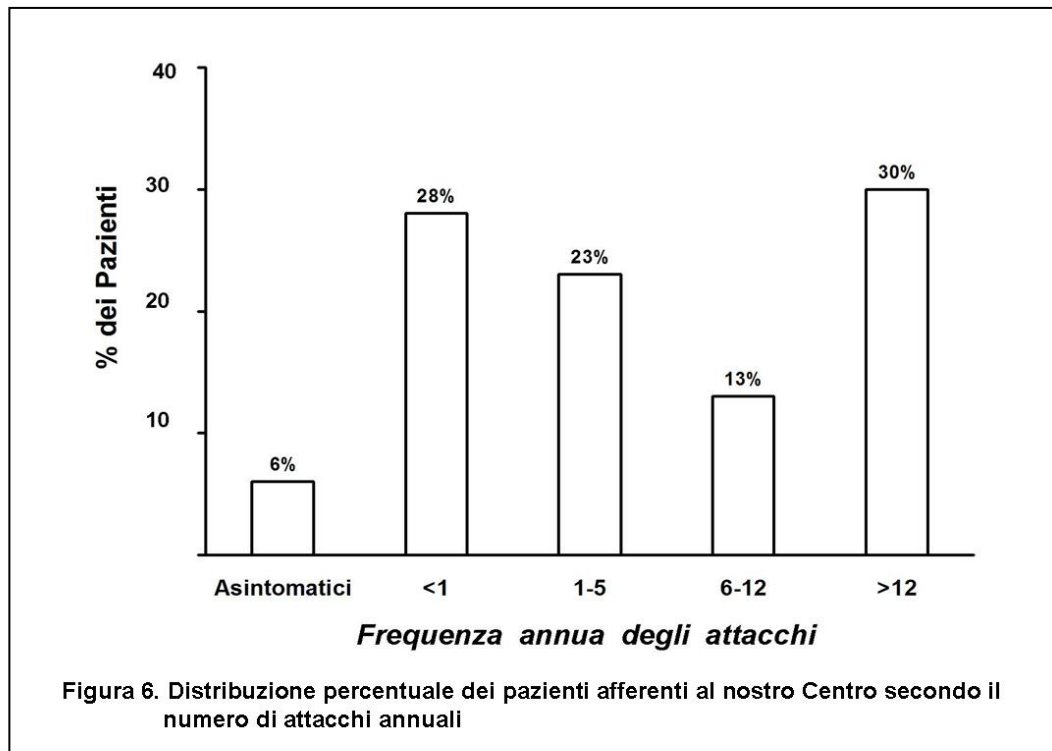
La **Figura 4** mostra la distribuzione percentuale dei pazienti nelle diverse fasce di età di insorgenza dei sintomi. Nella maggior parte dei casi, i primi attacchi si manifestano tra 1 e 5 anni. Il tipo di attacco d'esordio più frequente (circa l'80% dei casi) è rappresentato dall'attacco periferico (generalmente al volto).



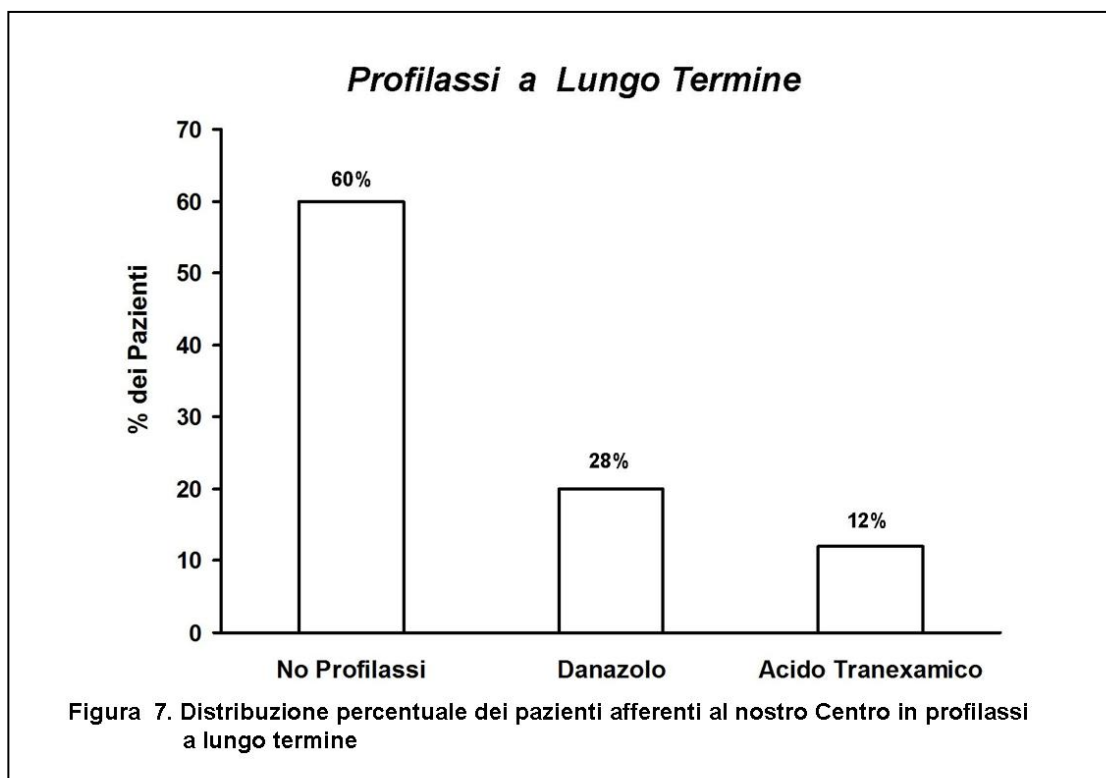
Nel corso degli anni, la maggior parte dei pazienti continuava a presentare l'attacco periferico come forma di localizzazione più frequente (97% degli attacchi totali) (**Figura 5**). La seconda localizzazione più frequente è costituita da quella addominale. In realtà, gran parte dei pazienti presentavano l'attacco combinato al volto (periferico) ed addominale. Un terzo circa dei pazienti presentava l'attacco laringeo (**Figura 5**), che si manifestava frequentemente come attacco isolato.



La **Figura 6** mostra la distribuzione percentuale dei pazienti secondo il numero di attacchi annuali. Questa distribuzione mostra due picchi di frequenza con un terzo dei pazienti che manifesta meno di un attacco/anno ed un altro terzo che presenta più di un attacco al mese.



La **Figura 7** indica che, nella nostra popolazione, la maggior parte dei pazienti non aveva necessità di profilassi a lungo termine. Il 40% dei pazienti, riferibile soprattutto a quel gruppo di pazienti con attacchi frequenti riportati nella Figura precedente, era in profilassi continua. Di questi, due terzi circa erano in profilassi con danazolo ed un terzo con acido tranexamico.



### **Pazienti Trattati con C1 Inibitore Ricombinante Umano**

I pazienti affetti da AE di età compresa tra i 16 ed i 70 anni seguiti presso il nostro Centro sono stati informati della possibilità di partecipare al trial clinico “Studio randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco di fase III per valutare l’efficacia e la sicurezza dell’inibitore ricombinante del fattore C1 umano per il trattamento di attacchi acuti in pazienti con angioedema ereditario”. Presso il nostro centro sono stati sottoposti alla valutazione iniziale 15 pazienti affetti da AE; tutti questi pazienti sono risultati arruolabili nello studio.

Durante questo trial clinico quattro dei pazienti arruolati sono stati trattati con il rhC1 Inh. Uno dei pazienti è stato trattato in due occasioni, la prima volta

durante lo studio in doppio cieco e la seconda volta durante la fase in aperto.

Altre tre pazienti sono state trattate con un'unica somministrazione in aperto.

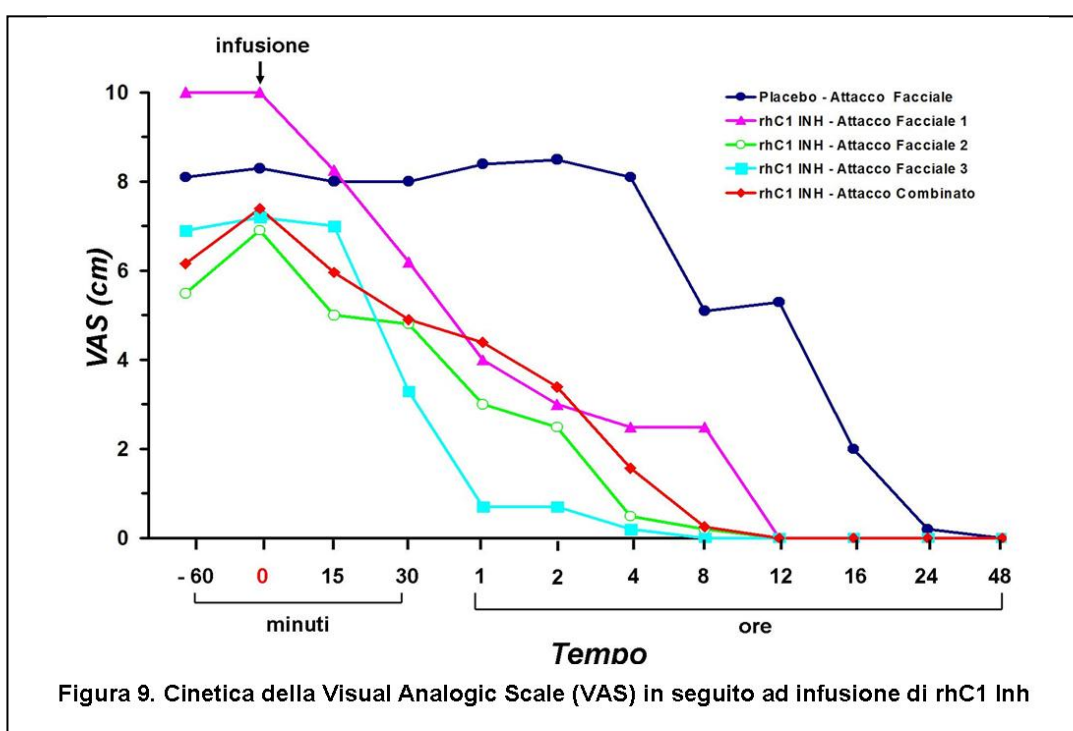
L'unico attacco trattato con placebo è stato un episodio di angioedema del volto (**Figura 8**). Il paziente, invitato a valutare l'intensità dell'attacco al tempo 0 (momento dell'infusione) mediante la VAS, ha attribuito un valore pari a 8. In assenza di terapia specifica, il paziente ha iniziato ad avvertire un lieve miglioramento (VAS pari a 6), ossia a raggiungere l'endpoint primario, solo dopo 12 ore dall'infusione, ed ha dichiarato di essere libero dai sintomi (endpoint secondario) solo al controllo svoltosi a 48 ore di distanza dall'infusione. Analogamente il PS, valutato al momento dell'infusione pari a 4, non ha subito modifiche fino alla dimissione del paziente dopo 8 ore.



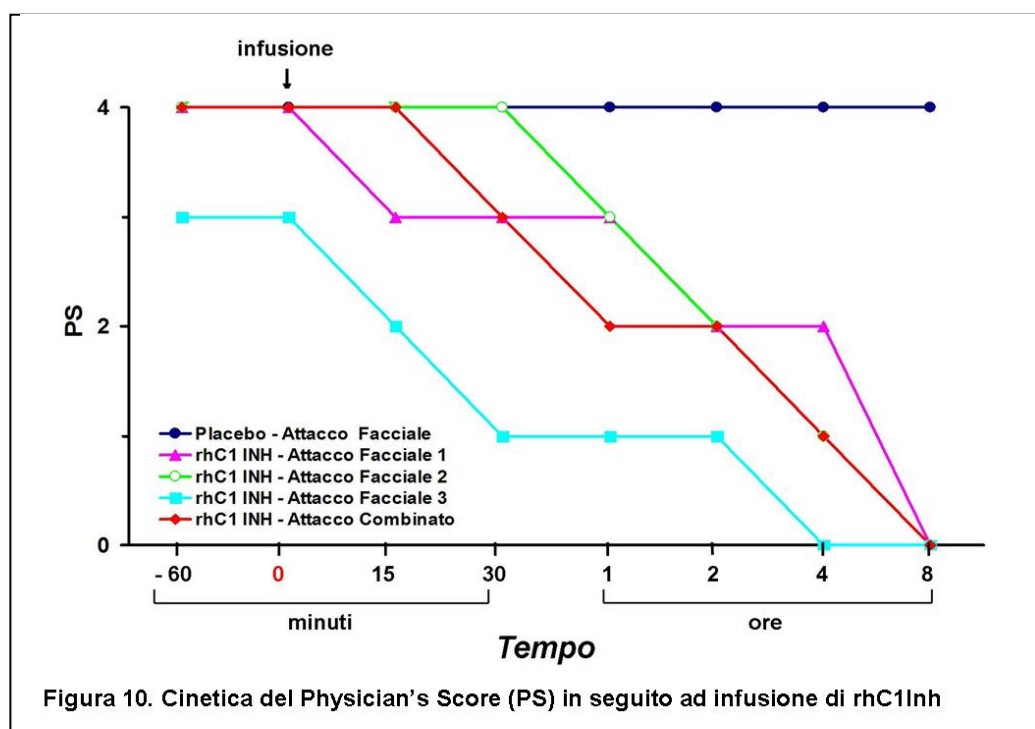
**Figura 8.** Angioedema del volto in paziente con AE

Lo stesso paziente, per un successivo attacco di angioedema facciale, è stato invece trattato con 350 mg di rhC1 Inh (indicato nelle **Figure 9 e 10** come Attacco Facciale 1). In questo caso il paziente aveva al tempo 0 valutato l'attacco con un valore di VAS pari a 10; il PS era anche in questo caso 4. Già dopo 15 minuti dall'infusione il paziente riferiva un significativo miglioramento dei sintomi e, dopo 12 ore, la loro completa risoluzione. Il PS veniva valutato pari a 0 già dopo 8 ore dall'infusione.

La risposta alla infusione di rhC1 Inh è risultata analoga anche negli attacchi facciali di altre due pazienti, indicate nelle **Figure 9 e 10** come Attacco Facciale 2 e 3.

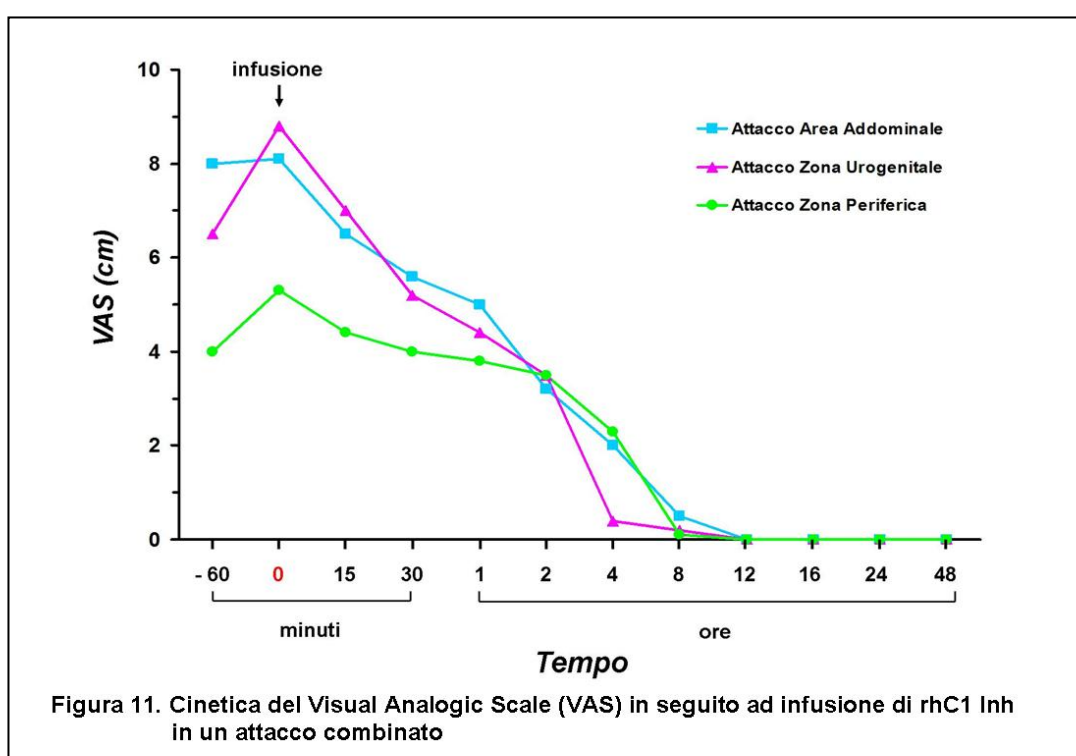






Il quinto attacco (indicato nelle **Figure 9 e 10** come Attacco Combinato) aveva caratteristiche leggermente differenti. L'episodio era caratterizzato dalla comparsa pressochè contemporanea di angioedema in differenti parti del corpo della paziente. Questa è una evenienza relativamente frequente negli attacchi di AE. Nel caso specifico la paziente lamentava angioedema periferico localizzato all'arto superiore destro, angioedema della zona urogenitale e intenso dolore addominale. Le tre localizzazioni sono state valutate dalla paziente separatamente (**Figura 11**) mediante VAS. Sebbene i valori della VAS al tempo dell'infusione siano differenti nei tre distretti colpiti, osservando la **Figura 11** è possibile rilevare che in tutti i distretti l'endpoint primario viene già raggiunto dopo i primi 15 minuti, mentre l'endpoint secondario, ossia la completa risoluzione dei sintomi, viene raggiunto dopo 12 ore. I valori delle

VAS e del PS inseriti nelle **Figure 9 e 10** si riferiscono nell'Attacco Combinato alla media dei valori dei tre distretti in ogni tempo considerato. E' importante sottolineare che in tutti gli attacchi in aperto descritti sono stati somministrati ai pazienti 350 mg di rhC1 Inh. In nessun caso è stato necessario somministrare ai pazienti la seconda dose di rhC1 Inh permessa e consigliata dal protocollo qualora non vi sia risposta soddisfacente alla prima infusione.



## DISCUSSIONE

In questo studio sono stati valutati gli aspetti diagnostici, clinici e terapeutici in una popolazione di pazienti affetti da AE della Regione Campania. Sono stati presentati inoltre dei dati preliminari di una sperimentazione clinica in pazienti affetti da angioedema acuto trattati con successo con rhC1 Inh.

Un dato particolarmente rilevante di questo studio consiste nel tempo medio intercorso tra la prima presentazione dei sintomi e la diagnosi, che è risultato di circa 15 anni. Questo dato è verosimilmente legato al fatto che la maggior parte dei nostri pazienti era costituita da casi sporadici della malattia, in cui non erano rilevabili all'anamnesi familiare altri individui con la patologia clinicamente manifesta. Nel caso di questi pazienti, la mutazione si era verosimilmente presentata per la prima volta (mutazione de novo). La diagnosi di AE è molto rapida quando è noto che altri familiari od ascendenti presentavano crisi ricorrenti di angioedema. Anche nei casi in cui non vi sia storia familiare della malattia la diagnosi di AE è comunque ipotizzabile già sulla base di specifiche caratteristiche cliniche (angioedema ricorrente non infiammatorio non infiammatorio e non associato ad orticaria). Tranne rari casi, la conferma biochimica della diagnosi è facilmente ottenibile attraverso indagini ematochimiche relativamente semplici da effettuare (dosaggio antigenico e funzionale del C1 Inh. L'esperienza di questo studio dimostra che il vero problema dei pazienti con AE è la possibilità, ad una valutazione

superficiale, di etichettare i loro sintomi come allergici. In alcuni casi ciò comporta un notevole ritardo nella diagnosi con possibilità di sviluppo di attacchi potenzialmente pericolosi quali quelli laringei. Anche se rimane una malattia rara, l'AE va sempre preso in considerazione quando si affronta un paziente con angioedema senza orticaria e senza una causa allergica prontamente evidente. La mancata diagnosi produce indagini diagnostiche spesso inutili, espone il paziente a rischio di vita e lo sottrae a provvedimenti terapeutici destinati a migliorarne drasticamente la qualità di vita.

Attualmente i pazienti affetti da AE hanno a propria disposizione diverse opzioni terapeutiche. I farmaci attualmente disponibili per la profilassi a lungo termine e la terapia dell'attacco acuto permettono ai pazienti di prevenire e trattare in maniera molto efficace gli attacchi di AE. La parte di questo studio dedicata alla sperimentazione clinica con la forma ricombinante di C1 Inh ha evidenziato che questo farmaco consente di ridurre significativamente la durata e la severità degli attacchi. L'eventuale immissione in commercio del rhC1 Inh potrebbe ulteriormente alleviare le preoccupazioni dei pazienti. Questo farmaco ha il vantaggio teorico di eliminare il rischio di trasmissione di patologie infettive. Inoltre c'è la possibilità di reperire quantità illimitate di farmaco, non essendoci più la dipendenza della produzione del farmaco dalla disponibilità di sangue umano da donatori. D'altra parte va considerato il fatto che il farmaco ricombinante deriva da conigli transgenici e, sebbene sia altamente purificato, potrebbe portare al rischio teorico di

trasmissione di patologie animali od a reazioni allergiche verso proteine del coniglio.

I pazienti randomizzati e trattati nell'ambito di questo studio in numerosi Centri in Italia e all'estero sono finora 87 ed i risultati sono molto incoraggianti. 11 pazienti sono stati trattati con rhC1 Inh in tre diverse occasioni e nessuno di essi ha finora sviluppato reazioni allergiche o mostrato riduzione dell'efficacia del farmaco dopo somministrazioni ripetute. Purtroppo, a causa della rarità della patologia, la significatività dei numeri fin qui raggiunti è ancora esigua, per cui è necessaria ulteriore esperienza clinica in merito all'utilizzo del farmaco ricombinante.

Una interessante caratteristica del rhC1 Inh è che, nonostante la sua emivita sia più breve del C1 Inh emoderivato, non sono state finora descritte riacutizzazioni dell'angioedema dopo iniziale successo del trattamento. L'ipotesi più probabile è che una transitoria normalizzazione dei valori di C1 Inh sia sufficiente a bloccare i vari pathways che sono alla base della patogenesi dell'AE.

In conclusione, i risultati iniziali della sperimentazione clinica indicano che il trattamento degli attacchi acuti di angioedema con rhC1 Inh sembra essere efficace e sicuro. Questo presidio terapeutico potrebbe rappresentare una nuova strategia per la terapia dei pazienti affetti da AE.

## BIBLIOGRAFIA

1. Agostoni, A., E. Aygoren-Pursun, K. E. Binkley, A. Blanch, K. Bork, L. Bouillet, C. Bucher, A. J. Castaldo, M. Cicardi, A. E. Davis, C. De Carolis, C. Drouet, C. Duponchel, H. Farkas, K. Fay, B. Fekete, B. Fischer, L. Fontana, G. Fust, R. Giacomelli, A. Groner, C. E. Hack, G. Harmat, J. Jakenfelds, M. Juers, L. Kalmar, P. N. Kaposi, I. Karadi, A. Kitzinger, T. Kollar, W. Kreuz, P. Lakatos, H. J. Longhurst, M. Lopez-Trascasa, I. Martinez-Saguer, N. Monnier, I. Nagy, E. Nemeth, E. W. Nielsen, J. H. Nuijens, C. O'Grady, E. Pappalardo, V. Penna, C. Perricone, R. Perricone, U. Rauch, O. Roche, E. Rusicke, P. J. Spath, G. Szendei, E. Takacs, A. Tordai, L. Truedsson, L. Varga, B. Visy, K. Williams, A. Zanichelli, and L. Zingale. 2004. Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 114:S51-131.
2. Donaldson, V. H., and R. R. Evans. 1963. A Biochemical Abnormality in Hereditary Angioneurotic Edema: Absence of Serum Inhibitor of C' 1-Esterase. *Am J Med* 35:37-44.
3. Carugati, A., E. Pappalardo, L. C. Zingale, and M. Cicardi. 2001. C1-inhibitor deficiency and angioedema. *Mol Immunol* 38:161-173.
4. Davis, A. E., 3rd. 1988. C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol* 6:595-628.

5. Davis, A. E., 3rd. 2006. Mechanism of angioedema in first complement component inhibitor deficiency. *Immunol Allergy Clin North Am* 26:633-651.
6. Han, E. D., R. C. MacFarlane, A. N. Mulligan, J. Scafidi, and A. E. Davis, 3rd. 2002. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest* 109:1057-1063.
7. Pappalardo, E., S. Caccia, C. Suffritti, A. Tordai, L. C. Zingale, and M. Cicardi. 2008. Mutation screening of C1 inhibitor gene in 108 unrelated families with hereditary angioedema: functional and structural correlates. *Mol Immunol* 45:3536-3544.
8. HAEdb. <http://hae.enzim.hu>.
9. Cicardi, M., L. Bergamaschini, M. Cugno, A. Beretta, L. C. Zingale, M. Colombo, and A. Agostoni. 1998. Pathogenetic and clinical aspects of C1 inhibitor deficiency. *Immunobiology* 199:366-376.
10. Cicardi, M., and A. Agostoni. 1996. Hereditary angioedema. *N Engl J Med* 334:1666-1667.
11. Zahedi, R., J. Wisnieski, and A. E. Davis, 3rd. 1997. Role of the P2 residue of complement 1 inhibitor (Ala443) in determination of target protease specificity: inhibition of complement and contact system proteases. *J Immunol* 159:983-988.
12. Cicardi, M., and L. C. Zingale. 2007. The deficiency of C1 inhibitor and its treatment. *Immunobiology* 212:325-331.

13. Nussberger, J., M. Cugno, C. Amstutz, M. Cicardi, A. Pellacani, and A. Agostoni. 1998. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 351:1693-1697.
14. Nussberger, J., M. Cugno, M. Cicardi, and A. Agostoni. 1999. Local bradykinin generation in hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 104:1321-1322.
15. Shoemaker, L. R., S. J. Schurman, V. H. Donaldson, and A. E. Davis, 3rd. 1994. Hereditary angioneurotic oedema: characterization of plasma kinin and vascular permeability-enhancing activities. *Clin Exp Immunol* 95:22-28.
16. Zuraw, B. L. 2008. Clinical practice. Hereditary angioedema. *N Engl J Med* 359:1027-1036.
17. Nzeako, U. C., E. Frigas, and W. J. Tremaine. 2001. Hereditary angioedema: a broad review for clinicians. *Arch Intern Med* 161:2417-2429.
18. Binkley, K. E., and A. E. Davis, 3rd. 2003. Estrogen-dependent inherited angioedema. *Transfus Apher Sci* 29:215-219.
19. Bowen, T., M. Cicardi, H. Farkas, K. Bork, W. Kreuz, L. Zingale, L. Varga, I. Martinez-Saguer, E. Aygoren-Pursun, K. Binkley, B. Zuraw, A. Davis, 3rd, J. Hebert, B. Ritchie, J. Burnham, A. Castaldo, A. Menendez, I. Nagy, G. Harmat, C. Bucher, G. Lacuesta, A. Issekutz, R. Warrington, W. Yang, J. Dean, A. Kanani, D. Stark, C. McCusker, E. Wagner, G. E. Rivard, E. Leith, E. Tsai, M. MacSween, J. Lyanga, B.



- Serushago, A. Leznoff, S. Wasserman, and J. de Serres. 2004. Canadian 2003 International Consensus Algorithm For the Diagnosis, Therapy, and Management of Hereditary Angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 114:629-637.
20. Davis, A. E., 3rd. 2003. The pathogenesis of hereditary angioedema. *Transfus Apher Sci* 29:195-203.
  21. Zuraw, B. L. 2003. Diagnosis and management of hereditary angioedema: an American approach. *Transfus Apher Sci* 29:239-245.
  22. Agostoni, A., and M. Cicardi. 1992. Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)* 71:206-215.
  23. Rosen, F. S., C. A. Alper, J. Pensky, M. R. Klemperer, and V. H. Donaldson. 1971. Genetically determined heterogeneity of the C1 esterase inhibitor in patients with hereditary angioneurotic edema. *J Clin Invest* 50:2143-2149.
  24. Binkley, K. E., and A. Davis, 3rd. 2000. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 106:546-550.
  25. Bork, K., S. E. Barnstedt, P. Koch, and H. Traupe. 2000. Hereditary angioedema with normal C1-inhibitor activity in women. *Lancet* 356:213-217.
  26. Cichon, S., L. Martin, H. C. Hennies, F. Muller, K. Van Driessche, A. Karpushova, W. Stevens, R. Colombo, T. Renne, C. Drouet, K. Bork,

- and M. M. Nothen. 2006. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 79:1098-1104.
27. Farkas, H., G. Harmat, A. Fay, B. Fekete, I. Karadi, B. Visy, and L. Varga. 2001. Erythema marginatum preceding an acute oedematous attack of hereditary angioneurotic oedema. *Acta Derm Venereol* 81:376-377.
  28. Farkas, H., G. Harmat, P. N. Kaposi, I. Karadi, B. Fekete, G. Fust, K. Fay, A. Vass, and L. Varga. 2001. Ultrasonography in the diagnosis and monitoring of ascites in acute abdominal attacks of hereditary angioneurotic oedema. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:1225-1230.
  29. Frank, M. M., J. A. Gelfand, and J. P. Atkinson. 1976. Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management. *Ann Intern Med* 84:580-593.
  30. Bork, K., G. Meng, P. Staubach, and J. Hardt. 2006. Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course. *Am J Med* 119:267-274.
  31. Markovic, S. N., D. J. Inwards, E. A. Frigas, and R. P. Phylly. 2000. Acquired C1 esterase inhibitor deficiency. *Ann Intern Med* 132:144-150.
  32. Cicardi, M., L. C. Zingale, E. Pappalardo, A. Folcioni, and A. Agostoni. 2003. Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies. *Medicine (Baltimore)* 82:274-281.

33. Castelli, R., D. L. Deliliers, L. C. Zingale, E. M. Pogliani, and M. Cicardi. 2007. Lymphoproliferative disease and acquired C1 inhibitor deficiency. *Haematologica* 92:716-718.
34. Zingale, L. C., R. Castelli, A. Zanichelli, and M. Cicardi. 2006. Acquired deficiency of the inhibitor of the first complement component: presentation, diagnosis, course, and conventional management. *Immunol Allergy Clin North Am* 26:669-690.
35. Zingale, L. C., L. Beltrami, A. Zanichelli, L. Maggioni, E. Pappalardo, B. Cicardi, and M. Cicardi. 2006. Angioedema without urticaria: a large clinical survey. *Cmaj* 175:1065-1070.
36. Bas, M., V. Adams, T. Suvorava, T. Niehues, T. K. Hoffmann, and G. Kojda. 2007. Nonallergic angioedema: role of bradykinin. *Allergy* 62:842-856.
37. Weldon, D. 2006. Differential diagnosis of angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am* 26:603-613.
38. Cicardi, M., Zingale, L.C., Zanichelli, A., Triggiani, M., Perricone, R., Cillari, E., Cancian, M., Arcoleo, F., Bova, M., De Carolis, C., De Marchi, M., Ferlazzo, B., Fontana, L., Guarino, M.D., Marone, G., Montinaro, V., Neri, S., Pucci, S., Zanierato, G. 2008, in press. Angioedema ereditario da carenza di C1 inibitore. Consensus document italiano per la diagnosi e la terapia. *It J Allergy Clin Immunol* IV.

39. Byrd, J. B., A. Adam, and N. J. Brown. 2006. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am* 26:725-737.
40. Frank, M. M. 1979. Effect of sex hormones on the complement-related clinical disorder of hereditary angioedema. *Arthritis Rheum* 22:1295-1299.
41. Bouillet, L., H. Longhurst, I. Boccon-Gibod, K. Bork, C. Bucher, A. Bygum, T. Caballero, C. Drouet, H. Farkas, C. Massot, E. W. Nielsen, D. Ponard, and M. Cicardi. 2008. Disease expression in women with hereditary angioedema. *Am J Obstet Gynecol* 199:484 e481-484.
42. Gelfand, J. A., R. J. Sherins, D. W. Alling, and M. M. Frank. 1976. Treatment of hereditary angioedema with danazol. Reversal of clinical and biochemical abnormalities. *N Engl J Med* 295:1444-1448.
43. Frank, M. M. 2006. Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management in the United States. *Immunol Allergy Clin North Am* 26:653-668.
44. Cicardi, M., R. Castelli, L. C. Zingale, and A. Agostoni. 1997. Side effects of long-term prophylaxis with attenuated androgens in hereditary angioedema: comparison of treated and untreated patients. *J Allergy Clin Immunol* 99:194-196.
45. Szeplaki, G., L. Varga, S. Valentin, M. Kleiber, I. Karadi, L. Romics, G. Fust, and H. Farkas. 2005. Adverse effects of danazol prophylaxis

- on the lipid profiles of patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 115:864-869.
46. Bork, K., A. Bygum, and J. Hardt. 2008. Benefits and risks of danazol in hereditary angioedema: a long-term survey of 118 patients. *Ann Allergy Asthma Immunol* 100:153-161.
  47. Sheffer, A. L., K. F. Austen, and F. S. Rosen. 1972. Tranexamic acid therapy in hereditary angioneurotic edema. *N Engl J Med* 287:452-454.
  48. Farkas, H., L. Varga, G. Szeplaki, B. Visy, G. Harmat, and T. Bowen. 2007. Management of hereditary angioedema in pediatric patients. *Pediatrics* 120:e713-722.
  49. Gompels, M. M., R. J. Lock, M. Abinun, C. A. Bethune, G. Davies, C. Grattan, A. C. Fay, H. J. Longhurst, L. Morrison, A. Price, M. Price, and D. Watters. 2005. C1 inhibitor deficiency: consensus document. *Clin Exp Immunol* 139:379-394.
  50. Bork, K., and S. E. Barnstedt. 2001. Treatment of 193 episodes of laryngeal edema with C1 inhibitor concentrate in patients with hereditary angioedema. *Arch Intern Med* 161:714-718.
  51. Bork, K., G. Meng, P. Staubach, and J. Hardt. 2005. Treatment with C1 inhibitor concentrate in abdominal pain attacks of patients with hereditary angioedema. *Transfusion* 45:1774-1784.
  52. Waytes, A. T., F. S. Rosen, and M. M. Frank. 1996. Treatment of hereditary angioedema with a vapor-heated C1 inhibitor concentrate. *N Engl J Med* 334:1630-1634.

53. Kunschak, M., W. Engl, F. Maritsch, F. S. Rosen, G. Eder, G. Zerlauth, and H. P. Schwarz. 1998. A randomized, controlled trial to study the efficacy and safety of C1 inhibitor concentrate in treating hereditary angioedema. *Transfusion* 38:540-549.
54. Cicardi, M., and L. Zingale. 2003. How do we treat patients with hereditary angioedema. *Transfus Apher Sci* 29:221-227.
55. Farkas, H., L. Jakab, G. Temesszentandrasi, B. Visy, G. Harmat, G. Fust, G. Szeplaki, B. Fekete, I. Karadi, and L. Varga. 2007. Hereditary angioedema: a decade of human C1-inhibitor concentrate therapy. *J Allergy Clin Immunol* 120:941-947.
56. van Doorn, M. B., J. Burggraaf, T. van Dam, A. Eerenberg, M. Levi, C. E. Hack, R. C. Schoemaker, A. F. Cohen, and J. Nuijens. 2005. A phase I study of recombinant human C1 inhibitor in asymptomatic patients with hereditary angioedema. *J Allergy Clin Immunol* 116:876-883.
57. Choi, G., M. R. Soeters, H. Farkas, L. Varga, K. Obtulowicz, B. Bilo, G. Porebski, C. E. Hack, R. Verdonk, J. Nuijens, and M. Levi. 2007. Recombinant human C1-inhibitor in the treatment of acute angioedema attacks. *Transfusion* 47:1028-1032.
58. Zuraw, B. L., and S. C. Christiansen. 2008. New promise and hope for treating hereditary angioedema. *Expert Opin Investig Drugs* 17:697-706.
59. Schneider, L., W. Lumry, A. Vegh, A. H. Williams, and T. Schmalbach. 2007. Critical role of kallikrein in hereditary angioedema

pathogenesis: a clinical trial of ecallantide, a novel kallikrein inhibitor.

*J Allergy Clin Immunol* 120:416-422.

60. Cicardi, M., L. Zingale, A. Zanichelli, and D. L. Deliliers. 2007.

Established and new treatments for hereditary angioedema: An update.

*Mol Immunol* 44:3858-3861.

61. Bork, K., J. Frank, B. Grundt, P. Schlattmann, J. Nussberger, and W.

Kreuz. 2007. Treatment of acute edema attacks in hereditary angioedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (Icatibant). *J*

*Allergy Clin Immunol* 119:1497-1503.